

接种量增加了 3.65 倍。接着是细胞的缓慢生长期, 细胞在这一时期生物量略有下降。细胞中 GKB 的含量在接种后的 3~6 d 略有下降, 12~18 d 是银杏内酯的快速积累期, 第 18 天细胞中的银杏内酯含量最高, 达到 $302 \mu\text{g/g DW}$, 之后至第 21 天含量略有下降。因此在以后的研究中, 细胞的收获期不超过 20 d

2.4 继代悬浮培养过程中银杏内酯 B 合成稳定性研究: 在悬浮培养过程中, 很多植物细胞由于形态分化受到抑制和染色体发生变异, 使目的产物含量降低甚至消失, 如红豆杉中的紫杉醇, 随着继代次数的增加, 紫杉醇的含量迅速降低, 因而建立具有高而稳定的目的产物的细胞系是实现细胞大规模培养生产次生代谢物的关键之一。我们对细胞系 MH-3 进行了连续 6 代的继代培养, 结果如表 3 在继代培养过

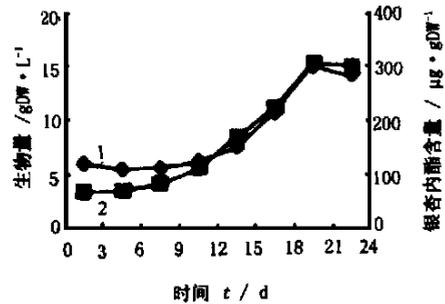
表 3 细胞系 MH-3 继代培养的稳定性的稳定性

| 继代次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 平均值 \bar{X} | 变异系数 (s/\bar{X}) |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|
| 生长指数 | 3.68 | 4.16 | 3.46 | 3.78 | 4.01 | 3.52 | 3.77 | 0.073 |
| GB 含量 ($\mu\text{g/g DW}$) | 340 ± 45.2 | 260 ± 31.2 | 280 ± 22.4 | 310 ± 34.3 | 320 ± 48.0 | 240 ± 26.4 | 293 ± 38.1 | 0.131 |

产银杏内酯细胞系取得明显效果, 选出的细胞系生产银杏内酯 B 的能力比原来的愈伤组织有了显著提高, 且其生产能力在继代过程中表现稳定, 在细胞悬浮培养过程中银杏内酯合成代谢的优化控制将另文报道。这些研究为今后实现银杏细胞大规模培养生产银杏内酯打下了良好基础

参考文献:

- [1] 冯汉林, 郑意端. 银杏苦内酯 B 及其同系物的药理作用 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 725-755.
- [2] Corey E J, Kang M C, Desai M C, et al. Total syntheses of (\pm)-ginkgolide B [J]. JAM Chem Soc, 1988, 110(2): 649-



1-银杏内酯 B 2-生物量

图 1 悬浮培养时细胞生长和银杏内酯合成时间进程

程中, 细胞的生长指数和银杏内酯含量没有随继代次数的增加而明显下降, 其变异系数分别为 0.073 和 0.131, 性状表现稳定

采用缺氧胁迫小细胞团法从愈伤组织中选育高

651.

- [3] Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkg biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture [J]. Plant Cell Report, 1990, 8: 635-638.
- [4] 戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 不同培养基、激素、碳源和氮源对银杏愈伤组织生长及银杏内酯 B 形成的影响 [J]. 中草药, 1998, 29(增刊): 63-66.
- [5] 于荣敏, 赵鸿莲, 张辉, 等. 银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 207-210.
- [6] 虞杏英, 庄向平, Braquet P, 等. 高效液相色谱分析银杏叶中的银杏内酯 B [J]. 药物分析, 1993, 13(2): 85-87.

5S-rRNA 基因间区序列变异用于金银花药材道地性研究初探

李萍, 蔡朝晖, 邢俊波*

(中国药科大学 生药学教研室, 江苏 南京 210038)

摘要: 目的 研究金银花药材道地性形成的基因基础。方法 用 SDS 法提取金银花 *Lonicera japonica* 不同居群、外类群细毡毛忍冬 *L. similis* 和山银花 *L. confusa* 的总 DNA, 进行 5S-rRNA 基因间区的 PCR 扩增和测序, 并用软件 Mega 进行分析。结果 *Lonicera* L. 属植物 5S-rRNA 基因间区约 210 bp, 其中 G+C 含量较高, 达 70% 左右, 不同居群的 *L. japonica* 碱基序列有差别, 通过测序可以进行鉴别。 *L. confusa* 与 *L. japonica* 间的遗传距离较大。结论 种间 5S-rRNA 基因间区的序列差异大于种内; 道地药材之间的遗传距离较小; 道地与非道地药材之间的遗传距

* 收稿日期: 2000-12-04

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730500), 教育部优秀教师资助计划项目, 江苏省“333”工程项目资助

作者简介: 李萍 (1960-), 女, 辽宁大连人, 教授, 博士生导师, 理学博士, 国家有突出贡献的中青年专家。1982年毕业于辽宁中医学院中药系, 1988年毕业于中国药科大学生药学专业, 获得博士学位。1992年任副教授, 1995年破格晋升为教授。主要研究方向: 中药材的品种鉴定、质量评价及活性成分研究。Tel: (025) 5322256 Fax: 025-5322448 E-mail: lipingl@publicl.ptt.js.cn

离大于道地药材之间的遗传距离。

关键词: 金银花; 道地性; 5S-rRNA 基因间区序列

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)09-0834-04

Preliminary attempt to identify geoherbalsm of *Flos Lonicerae* by sequence divergence of 5S-rRNA gene spacer region

LI Ping, CAI Zhao-hui, XING Jun-bo

(Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 210038, China)

Abstract Object To study the formation of geoherbalsm of *Flos Lonicerae* on the molecular level.

Methods Genomic DNAs from different populations of *Lonicera japonica* Thunb., outgroup *Lonicera similis* Hemsl., and *Lonicera confusa* DC. were extracted, the 5S-rRNA gene spacer region amplified, sequenced, and analysed with Mega 1.02. **Results** The fragments of 5S-rRNA gene spacer region in *Lonicera L.* was about 210 bp with G+C content up to about 70%. The sequences were different in various populations, and can be identified by sequencing. The genetic distance between *L. confusa* and *L. japonica* was larger. **Conclusion** The genuine distance between species was larger than that within species; the genetic distance among genuine crude drugs was smaller; the genetic distance among genuine and ungenue crude drugs were bigger than that among genuine crude drugs.

Key words *Flos Lonicerae*; geoherbalsm; sequence of 5S-rRNA gene spacer region

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花,有较强的抗菌作用,对多种急、慢性炎症等有较好的疗效。金银花药材有明显的道地性,如通过我们对氯原酸含量的初步测定表明,道地产区河南和山东金银花的绿原酸含量普遍高于其它非道地产区,显示药材质量与地域、生境等密切相关^[1]。品质优良是道地药材的表现型,它是道地药材基因型内因与特定的环境饰变外因长期作用的结果,特定的基因产生特定的酶,进而调控次生代谢产物的产生,因而特定的基因是药材道地性形成的关键。

在真核生物细胞中,编码 5S-rRNA 的基因以串联重复的形式存在,每个重复单位包括一个大约 120 bp 的编码区和长度在 100~700 bp 之间的转录间隔区。编码区的序列非常保守,而间隔区在不同的种间,甚至在种内都会有差别^[2-5],因此通过测定间隔区的碱基序列可以进行种间或种内水平的差异的研究。为此我们以 5S-rRNA 编码区的两段寡核苷酸序列 AS 和 AS-1 为引物,对金银花不同居群及细毡毛忍冬、山银花的 5S-rRNA 基因间区片段进行扩增并测序,以期研究金银花药材道地性的基因基础,并探讨 DNA 多态性对道地药材鉴别的意义。

1 材料与方法

1.1 材料: 样品为植物的新鲜嫩叶,快速干燥。金银花分别采自河南封丘,山东平邑、日照,河北石家庄,四川雅安,江苏南京 (J-J),细毡毛忍冬采自重庆 (J),山银花采自广西南宁 (J) 均经本文作者鉴定,

其中 J, J, J 为道地药材。

1.2 试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶, dNTPs, Agarose Gel DNA Extraction 试剂盒, BamHI, Boehringer Mannheim 公司, TA Cloning 试剂盒, T7 SequencingTM 试剂盒, Pharmacia Biotechnology 公司; WizardTM Plus Minipreps DNA Purification System, λ DNA/HindIII 分子量标记, Promega 公司; [α -³⁵S]dATP, Amersham 公司; 引物 AS, AS-1 由 Gibco-BRL 公司合成。

Robocycle Gradient 40 PCR 扩增仪 (Stratagene), IS 1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation), Sequi-Gen Sequencing Cell, MODEL 583 干胶机 (Bio-RAD) 等。

1.3 总 DNA 的提取: 参照文献^[7]方法。

1.4 PCR 扩增: 参照文献^[6]方法。

1.5 亚克隆和测序: PCR 产物亚克隆到 TA 克隆载体 pTAg 中。连接产物转化入 JM109 细胞后,铺于 LB 平板培养基中。通过颜色鉴别挑取白色的克隆在 3 mL LB 液体培养基中 37℃ 振荡培养过夜,碱裂解法进行质粒 DNA 的小量制备。质粒 DNA 经 BamHI 酶解检查后,选取重组质粒用 WizardTM Minipreps DNA Purification System 试剂盒进行制备。用 T7 SequencingTM 试剂盒进行测序。

1.6 数据分析: 所得序列输入计算机,经 Clustal W 软件排序,然后手工适当调整以尽量减少排列所需空隙 (gap) 的数目,排列好的序列用 Mega 分子进化遗传分析 (Molecular Evolutionary Genetics

Analysis) 1.02 软件进行序列分析,统计各样品序列间的 DNA 差异百分率(相对遗传距离)和转换+颠换数(绝对遗传距离)

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增和测序:所用的两段寡核苷酸引物分别位于 5S-rRNA 上。直接取总 DNA 进行 PCR 扩增,结果没有任何条带扩增出,可能是有 RNA 干扰的缘故。对总 DNA 进行基因纯化,即取总 DNA 20 μ L 经琼脂糖凝胶电泳后,切取含有未降解 DNA 片段处的凝胶,加入适量的 Milli-Q 水,放置过夜后,取此 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,此模板已除去了小片段的 DNA 和 RNA,扩增出了 5S-rRNA 间区的特异片段(图 1)。从图 1 看出,同属不同种和金银花不同居群所扩增出的 5S-rRNA 间区的长度几近相同,约为 300 bp

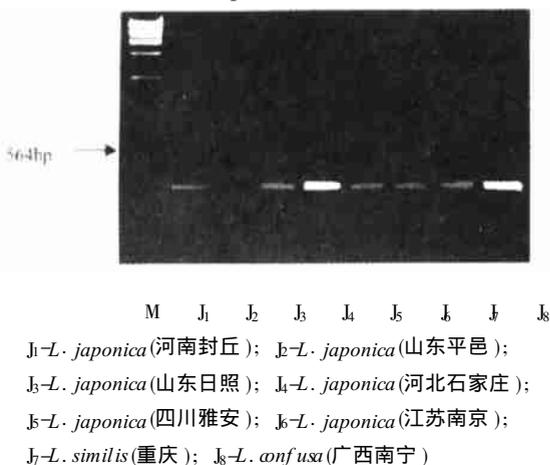


图 1 金银花 5S-rRNA 基因间区 PCR 扩增产物凝胶电泳图谱 MK λ DNA/Hind III 分子量标记

对 PCR 产物经克隆后测序,每个样品测定 3 个克隆,以避免 PCR 扩增可能带来的误差。除去位于 5S-rRNA 基因上的 85 bp,约为 210 bp,这些样品的基因序列已登录到 GenBank 上 *L. japonica* (J₁) AF207727, *L. japonica* (J₂) AF207728, *L. japonica* (J₃) AF207729, *L. japonica* (J₄) AF207733, *L. japonica* (J₅) AF207734, *L. japonica* (J₆) AF207736, *L. similis* (J₇) AF207732, *L. confusa* (J₈) AF207735。

从测序结果看出,不同样品的 5S-rRNA 基因间区碱基序列有差别,可以通过测序鉴别。 *L. japonica* 的不同居群间 5S-rRNA 基因间区碱基序列长度变化幅度大,相差 0~7 个碱基,作为外类群的细毡毛忍冬 *L. similis* 和山银花 *L. confusa* 序列长度介于金银花 *L. japonica* 各居群之间。金银花属植物 5S-rRNA 基因间区序列的 G+C 含量较其

它科属的植物要高,达 70% 左右。道地和非道地药材的 5S-rRNA 基因间区序列间没有大片的缺失和插入,仅是碱基间的替代。道地产区的 *L. japonica* (J₁ 和 J₂) 基因间区序列的 G+C 含量较不同居群和不同种金银花略高。

2.2 5S-rRNA 基因间区序列在道地药材研究中的价值:将排列好的 5S-rRNA 基因间区序列经软件 Mega1.02 分析。各居群间的变异位点为 40,信息位点为 9。除去缺失(gap)和对对(碱基)比较时,可得到序列间的绝对遗传距离及相对遗传距离以反映序列的分化,结果显示,种间遗传距离较大, *L. confusa* 与其它样品间的遗传距离最大,最高达 18 bp (*L. confusa* 与河北产 *L. japonica*),其次为 *L. similis* 与 *L. confusa* 间的遗传距离为 17 bp, *L. japonica* 与 *L. similis*、*L. confusa* 间的相对遗传距离分别为 5.93%、6.53%, *L. similis* 与 *L. confusa* 间的相对遗传距离为 5.34%,种间平均为 5.93%。 *L. japonica* 种内道地与非道地药材间的相对遗传距离平均为 4.03%。

道地药材间遗传距离较小, J₁、J₂ 和 J₃ 之间相对遗传距离分别为 1.44%、0.84% 和 1.89%,平均为 1.20%。 J₁ 与 J₂ 两个居群的金银花产地相近,但表型有较大差别, J₁ 俗称大毛花,全身密被长柔毛; J₂ 俗称鸡爪花,花蕾着生于花枝顶端,集中丛生,犹如鸡爪状,测序结果表明,它们有 4 个碱基的差别,但远小于不同种间的碱基差异数,这可能是天然杂交和人工选择的结果。

我们的研究结果表明,道地药材之间及道地与非道地药材之间,绿原酸的分析结果^[1]与本实验 5S-rRNA 基因间区序列变异是一致的,因此认为其成分差异与遗传基因变异有关,亦即基因的差异是金银花药材道地性的因素之一。另外我们的研究还表明,环境因子也有一定的影响,有关金银花药材道地性与基因的变化及环境因子的相关性目前正在深入研究中。

参考文献:

- [1] 邢俊波,李萍,胡世林.金银花道地药材品质评价研究 I—HPLC 法测定不同产地金银花中绿原酸的含量[J].中国野生植物资源,1999,18(6):44-46.
- [2] Vera H, Dagmar W. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S-rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Mathiola incana*) [J]. Genome, 1988, 62: 165-169.
- [3] Goldsbrough P B, Ellis T H N, Lomonosoff G P. Sequence variation and methylation of the Flax 5S-rRNA genes [J]. Nucl Acids Res, 1982, 10: 4501-4514.

- [4] Ganai M, Hemleben V. Comparison of ribosomal RNA genes in four closely related cucurbitaceae [J]. *Plant Syst Evol*, 1986, 154: 63-77.
- [5] Sastri K C. An Overview of evolution in plant 5S DNA [J]. *Plant Syst Evol*, 1992, 183: 169-176.
- [6] 蔡朝辉,李萍,董婷霞,等. 贝母的分子生物学方法的研究 [J]. *药学学报*, 2000, 35(4): 309-311.
- [7] 吴涛,王义权,余伯阳,等. RAPD在山麦冬属四种植物分类中的应用 [J]. *中草药*, 1998, 29(1): 37-40.

药用矿物蒙脱石的红外光谱分析

翟永功,左明雪*

(北京师范大学生命科学学院生物医学研究所,北京 100875)

摘要:目的 弄清蒙脱石层状晶体结构中水的变化规律,为其药用机制研究和药物的开发利用提供依据。方法 从粘土矿物中分离纯化蒙脱石,运用红外光谱分析技术,对蒙脱石的化学结构进行分析。结果 得到了有关蒙脱石分子水的信息和化学结构变化的基本规律。结论 蒙脱石是一种膨胀吸附性粘土矿物,可作为药物活性成分或赋形剂。

关键词:蒙脱石;红外光谱;结构分析

中图分类号: R282.760.3 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)09-0837-03

Analysis of mineral drug montmorillonite by IR spectra

ZHAI Yong-gong, ZUO Ming-xue

(College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Object In pursuit of a clear-cut view on the change of water molecules in the crystal lattice of montmorillonite, to provide a basis for the study of mechanism of action and its further development.

Methods The chemical structure of the mineral was studied by IR spectral analysis. **Results** Information concerning the change of water in regard to its chemical structure were obtained. **Conclusion** Montmorillonite is a mineral clay which can expand to exhibit its absorption properties, and can be used as an active absorbent excipient in drug formulation.

Key words montmorillonite; IR spectra; chemical structural analysis

蒙脱石是粘土矿物的一种,其作为药用矿物始载于《本草纲目拾遗》,为少常用中药,主用于治疗外创和解毒^[1]。别名,蒙脱土、白单等。蒙脱石粘土系凝灰岩或其他火山岩在碱性水的作用下蚀变而成。性味甘、温。近年来,国外有关蒙脱石类粘土矿物的药用研究日趋增多,特别是美国、法国、德国等国家在矿物药学(Pharmacology)方面的研究已较深入,用于治疗胃肠道疾病,尤其是治疗腹泻的天然矿物新药,如 SMECTA DIASORB GELOFALK 均已上市,其基本矿物成分为二八面体蒙脱石(Dioctahedral smectite, DS),已被美国 FDA 认证为“非处方药”,用于治疗腹泻性疾病^[3],1982年列入 WHO 腹泻病控制计划(The Diarrhea Disease

Control Program)^[4]。最新的药物临床研究报道,蒙脱石类矿物药对 HIV 病毒感染的 AIDS 病患者的腹泻有显著疗效^[2]。但矿物药材的地域性很强,不同的地质环境和同一矿床的不同层面,其矿物的化学组成和形态特征差异较大。本文是在对国产蒙脱石粘土进行化学分析、X 射线衍射分析、热分析和电镜分析的基础上,为了进一步揭示蒙脱石矿物的内部结构和药用物质基础,应用红外光谱分析技术,对蒙脱石粘土矿物进行了分析研究,为蒙脱石的药效学和药理学研究提供依据。剖析蒙脱石的药用物质基础,研究其药用性能,探讨具有我国自身的资源特色和医学背景的药用蒙脱石矿物,无疑对新药开发和矿物药理学研究具有重要意义。

* 收稿日期: 2000-11-12

基金项目: 国家新药基金资助项目

作者简介: 翟永功(1961-),男,陕西省岐山县人,副教授,西安交通大学生物医学工程博士,北京师范大学生物学博士后。现在北京师范大学生物医学研究所主要从事分子生物医学和天然药物化学方面的研究。主持国家新药基金、国家星火计划和省级科研基金项目 6 项,参加国家“八·五”、“九·五”攻关项目 2 项,发表论文 32 篇,参编著作 2 部。

Tel (010) 62206656 Fax: (010) 62206656 E-mail: ygzhai369@yahoo.com